TOYO INK

MultiColor-Luc™ Reporter Assay Kit

取扱い説明書

目次

		ページ
I.	本システムの概要/ライセンスに関する注意事項	2
II.	製品構成	3
III.	「MultiColor-Luc™ Reporter Assay Kitの保存方法	3
IV.	「MultiColor-Luc™ Reporter Assay System」の原理	4
V.	測定装置に関して	5
VI.	インターナル･コントロールに関して	6
VII.	「MultiColor-Luc™ Reporter Assay Kit」使用の準備	7
VIII.	3色のルシフェラーゼ発光測定のプロトコール	9
IX.	2色のルシフェラーゼ発光測定のプロトコール	10
X.	参考例	11
XI.	トラブルシューティング	12
XII.	関連製品	14
XIII.	安全上のご注意	15
XIV.	使用方法のご注意	15

東洋ビーネット株式会社

2005.8.

Ⅰ．「MultiColor-Luc™ Reporter Assay System」の概要

レポーター遺伝子を用いた試薬システムは、真核細胞における遺伝子の発現や制御に関する研究に貢献しています。弊社が開発した「ピッカジーン®」シリーズは、ホタル･ルシフェラーゼを用いたレポーターアッセイ･システムとして、多くの研究者の方々にご利用いただいております。

弊社はこの技術と経験を応用し、NEDO プロジェクトの支援のもと、産業技術総合研究所･近江谷先生との共同研究によって、従来のホタル･ルシフェラーゼを用いたレポーターアッセイでは不可能であった複数の転写活性の同時測定システムを開発しました。

「MultiColor-Luc™ Reporter Assay System」は、ホタルとは異なる甲虫から得られた、赤（RED）、緑（GR）、オレンジ（OR）の発光色の異なる 3 種のルシフェラーゼ遺伝子をレポーターとし、1 種類の試薬で同時発光させるシステムです。得られた3色の混合光を色識別できるルミノメーターを用いることにより、3因子のレポータアッセイ、あるいはインターナル･コントロールを用いた 2 因子のレポータアッセイが、同一の検体で 1 度に測定することができるようになります。このシステムは、弊社が開発した発光キット「MultiColor-Luc™ Reporter Assay Kit」によって、最適な発光反応およびアッセイ系を得ることができます。「MultiColor-Luc™ Reporter Assay Kit」は、専用細胞溶解剤と発光試薬の 2 試薬で構成されています。また、赤、緑、オレンジの各種ルシフェラーゼ遺伝子は、「MultiColor-Luc™ Reporter Vector」シリーズとしてご用意しております。

〈ライセンスに関する注意事項〉

- 本システムの発光試薬と細胞溶解剤は、東洋ビーネット（株）より特許出願中です。
- 本システムで用いている発光遺伝子は、独立行政法人　産業技術総合研究所　近江谷先生が特許出願をされています。東洋ビーネット㈱は、独立行政法人　産業技術総合研究所の許諾を受けております。
  発光遺伝子を産業用途等の営利目的の使用については、別途ライセンス契約が必要となります。
- 本取扱説明書内にある「ルミネッセンサーMCA」に関する記載は、アトー株式会社より特許出願中（特開 2004-333457）です。説明書内での特許内容に関する記載は同社による許可を受けております。算出式の使用、ライセンスに関しては各装置メーカーにお問い合わせください。
- 本製品は研究用試薬です。臨床診断用試薬としては使用しないでください。
- ライセンス契約に関しては、東洋ビーネット㈱[Tel：03-3272-1954]までお問い合わせください。

Ⅱ. 製品構成

製品名	コード No.	構成	保存条件
MultiColor-Luc™ Reporter Assay Kit	MCL10	発光試薬 10 mL×1 本	−80℃ (遮光)
		細胞溶解剤 10 mL×1 本	−20℃
	MCL50	発光試薬 50 mL×1 本	−80℃ (遮光)
		細胞溶解剤 30 mL×1 本	−20℃
	MCL1000	発光試薬 50 mL×20 本	−80℃ (遮光)
		細胞溶解剤 30 mL×1 本	−20℃
MultiColor-Luc™ Reporter Assay Cell Lysis Buffer	MCL-B30	細胞溶解剤 30 mL×1 本	−20℃

Ⅲ. 「MultiColor-Luc™ Reporter Assay Kit」の保存方法

1. 本システムは、凍結品です。受け取られた後は、直ちに、発光試薬は遮光して−80℃で、細胞溶解剤は−20℃で保存してください。
2. 本システムの発光試薬は、−80℃にて保存し、製品に記載された使用期限内に使用してください。
3. 本システムの細胞溶解剤は、−20℃にて保存し、製品に記載された使用期限内に使用してください。
4. 本システムの発光試薬は、凍結融解を繰り返すと試薬の発光能が低下することがあります。凍結融解 2 回以内で使用されることを推奨いたします。1 度の測定で使いきらない場合は、最初の試薬溶解時に小分けにして−80℃で遮光保存し、凍結融解をできるだけ避けることをお勧めします。
   また、別売のホタルルシフェラーゼ酵素セット (メーカーコード FL-50) を用いて、フィルターを使用しない全光量測定を行い、測定ごとに試薬の活性を確認してください。

IV. 「MultiColor-Luc™ Reporter Assay System」の原理

「MultiColor-Luc™ Reporter Assay System」は、赤、緑、オレンジ色の発光色が異なる 3 つのルシフェラーゼより生じる生物発光を用いたレポーターアッセイ･システムです（図 1.）。本システムでは、単一のサンプル中で、発光色の異なる 2 つ、または 3 つのルシフェラーゼを発現させ、各色の発光シグナルを測定します。

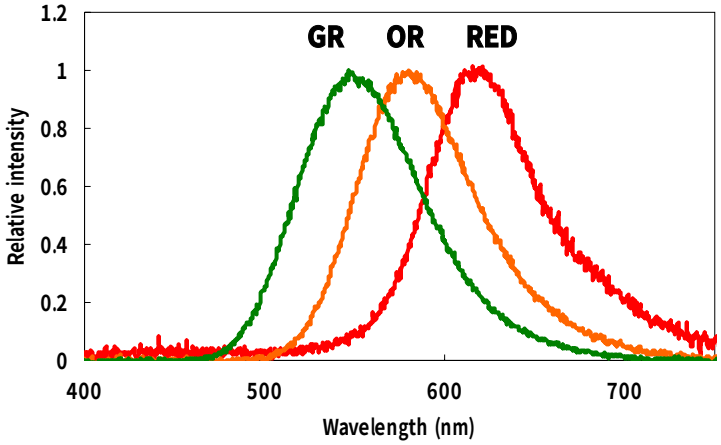

図 1. 3 色の発光甲虫ルシフェラーゼの発光スペクトル

ホタルに代表される生物発光は、ルシフェラーゼによるルシフェリンの酸化反応を通して光を生じます。ルシフェリンは、ルシフェラーゼ、マグネシウムイオン(Mg^{2+})存在下において、アデノシン三リン酸(ATP)と反応した後、酸素分子と反応して励起状態となり、基底状態に戻る際に光を発します（図 2.）。同一構造のルシフェリンを用いながらも、ルシフェラーゼの違いによりルシフェリンの状態が変化し、波長の異なる発光が生じます。このため、本システムでは、1 つの発光試薬を添加する 1 ステップのみで、2 または 3 種の、転写活性を同時に測定することが可能となります。

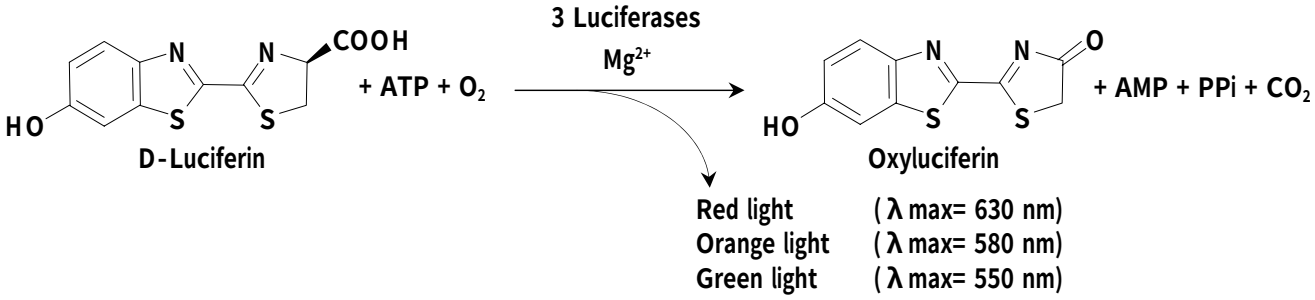

図 2 ． ホタル･ルシフェリン/ルシフェラーゼ反応の発光機構

レポーターアッセイ･システムに広く用いられている北米産ホタル *Photinus pyralis* 由来のルシフェラーゼは、pH や温度などの反応条件によって発光スペクトルが緑から赤へ変化する性質を持っており、多色発光に応用できませんでした。発光色の特異性を利用する本システムでは、pH などの反応条件で発光スペクトルが影響を受けない、甲虫由来の新規ルシフェラーゼを用いています。

- 赤色ルシフェラーゼ(RED)は、鉄道虫 *Phorixothrix hirtus* に由来し、最大発光波長（λ max= 630 nm）。
- 緑色ルシフェラーゼ(GR)は、イリオモテボタル *Rhagophthalmus ohbai* に由来し、最大発光波長（λ max= 550 nm）。
- オレンジ色ルシフェラーゼ(OR)は、イリオモテボタル *Rhagophthalmus ohbai* 由来の変異体で、最大発光波長（λ max= 580 nm）。

弊社では各ルシフェラーゼの発光反応を制御し、3 種の発光カイネティクスを安定化させる発光試薬を独自に開発しました（特許出願中）。また、3 つのルシフェラーゼの発光活性を最大限に生かすことができるように、本システムに最適化した細胞溶解剤の開発にも成功（特許出願中）しました。

Ⅴ．測定装置に関して

「MultiColor-Luc™ Reporter Assay Kit」は、3 色の発光甲虫ルシフェラーゼにより生じる発光シグナルを発光色の違いにより検出するシステムです。そのため、測定には発光波長の違いを検出できる測定装置と、測定値からルシフェラーゼごとの発光値の算出が必要となります。以下の点に留意し、測定方法を確認のうえ、使用を検討してください。

- 測定装置の検出波長レンジが、3 色の発光甲虫ルシフェラーゼの発光スペクトルに適した 400～800 nm(少なくとも 450～750 nm)の発光測定ができ、3 色の単色発光量が求められる性能があること。
- 3 色の発光甲虫ルシフェラーゼの発光スペクトルに適したフィルターを選択でき、フィルター装着が可能であること。
- 同時発光する 3 色の発光甲虫ルシフェラーゼの、フィルターを切り替えた連続測定が可能であること。
- 測定値からの各ルシフェラーゼ発光値の算出が可能であること。

「ルミネッセンサーMCA」および「カラフルックアナライザー」での測定

「ルミネッセンサーMCA （アトー株式会社, No.AB-2250）」および「カラフルックアナライザー（東洋紡績株式会社, No.CLX-101)」は、「MultiColor-Luc™ Reporter Assay System」で用いている 3 色の発光甲虫ルシフェラーゼの発光スペクトルに適した条件で同時測定が可能な、フォトマル内蔵のシングルチューブタイプのルミノメーターです。これらには、560 nmロングパスフィルターと 600 nmロングパスフィルターが標準装備されており、3つまでの異なる発光波長を同時に測定し、発光波長ごとの発光値を自動算出することができます。

「ルミネッセンサーMCA」および「カラフルックアナライザー」では、3 つのルシフェラーゼ（RED, OR, GR）を用いた場合、3 波長の発光値を以下の係数を用いて算出されています。

a) フィルターなしの全光の測定値： **F0**
b) フィルター1 を透過した測定値： **F1**
c) フィルター2 を透過した測定値： **F2**
d) サンプル中に含まれる各発光波長におけるフィルター透過率

RED のフィルターF1 透過率： **T1r**　OR のフィルターF1 透過率： **T1o**　GR のフィルターF1 透過率： **T1g**
RED のフィルターF2 透過率： **T2r**　OR のフィルターF2 透過率： **T2o**　GR のフィルターF2 透過率： **T2g**

RED, OR, GR ルシフェラーゼの発光値 **R**、**O**、**G** は、各ルシフェラーゼのフィルター透過率に比例することから、下記のような式で表すことができます。

$$F0 = R + G + O$$
$$F1 = T1r*R + T1o*O + T1g*G$$
$$F2 = T2r*R + T2o*O + T2g*G$$

したがって、RED, OR, GR ルシフェラーゼの発光値 **R**、**O**、**G** は、測定値 F0、F1、F2 と各フィルター透過率により以下のように算出できます。

$$R= \frac{(T1g*T2o-T1o*T2g)*F0+(T2g-T2o)*F1+(T1o-T1g)*F2}{T1g*T2o+T1r*T2g+T1o*T2r-T1g*T2r-T1r*T2o-T1o*T2g}$$

$$O= \frac{(T1r*T2g-T1g*T2r)*F0+(T2r-T2g)*F1+(T1g-T1r)*F2}{T1g*T2o+T1r*T2g+T1o*T2r-T1g*T2r-T1r*T2o-T1o*T2g}$$

$$G= \frac{(T1o*T2r-T1r*T2o)*F0+(T2o-T2r)*F1+(T1r-T1o)*F2}{T1g*T2o+T1r*T2g+T1o*T2r-T1g*T2r-T1r*T2o-To1*Tg2}$$

＊ この測定原理は、アトー株式会社より特許出願中(特開 2004-333457)です。

Ⅵ. インターナル･コントロールに関して

レポーター遺伝子としてルシフェラーゼを用いたアッセイ･システムでは、目的とするレポーターと共に、インターナル･コントロールをコトランスフェクションし、その値を用いてレポーターの活性値を標準化することをお勧めしています。インターナル･コントロールを用いると、以下のような要因を補正することが可能になります。

① ウェル間の細胞数や培養状態の違い
② プラスミド DNA のトランスフェクション効率の違い
③ 細胞ライセート回収時のハンドリング誤差
④ 測定時のピペッティング誤差

「MultiColor-Luc™ Reporter Assay Kit」では、同時に3つのルシフェラーゼの発光活性を測定できるため、インターナル･コントロールを用いたより正確なアッセイを容易に行うことができます。本システムでは、(1)フィルターを用いた測定装置での色識別による検出、(2)ルシフェラーゼによるプラスミドDNA量当たりの発光活性の相違という 2 点に留意し、レポーターとインターナル･コントロールの使い分け、プラスミドDNA量の条件設定など実験系の検討が必要となります (図 3.)。
インターナルコントロールとして用いるプラスミドDNA量は、測定時にレポーターとの発光活性比が **1～100 倍以内になるよう調整**してください。

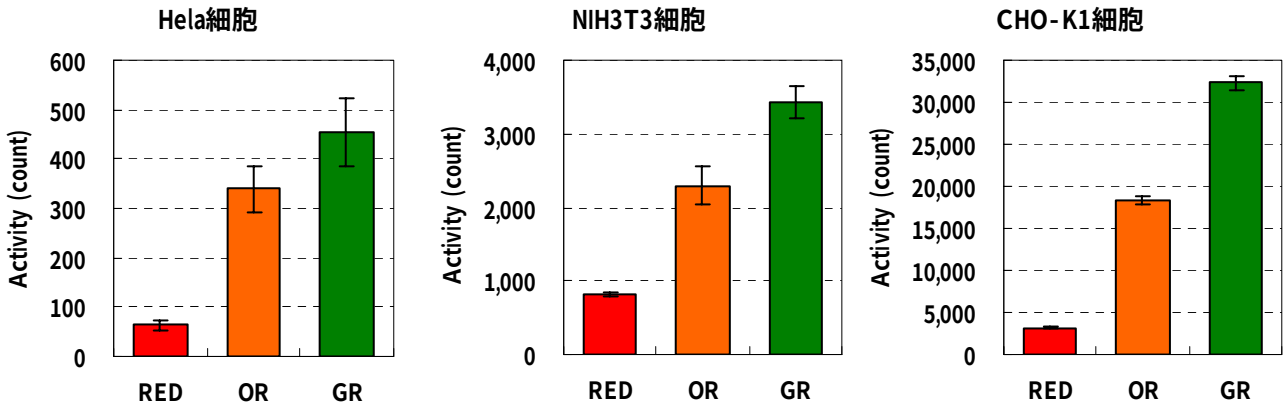

図 3. Hela、NIH3T3、CHO-K1 細胞における各ルシフェラーゼのプラスミド DNA 量当たりの発光量比較

24well プレートにて培養した NIH3T3, Hela, CHO-K1 細胞に各ルシフェラーゼ発現ベクターpSLR,O,G-SV40 を等量コトランスフェクションし、24 時間培養後ライセートを回収、発光活性を測定した。値は、トランスフェクションしたプラスミド DNA 量当たりの各ルシフェラーゼの発光量を示す。

ⅰ. 1 レポーター＋インターナル･コントロールの実験系 (Ⅸ章 (p.11)参照)

3 種のルシフェラーゼのうち 2 種を選び、1 種をレポーターとし、もう 1 種をインターナル･コントロールとして使用します。この場合、緑色ルシフェラーゼ (GR) をレポーターとし、赤色ルシフェラーゼ(RED)をインターナル･コントロールとして用いることをお勧めいたします。

ⅱ. 2 レポーター＋インターナル･コントロールの実験系 (Ⅷ章 (p.10)参照)

2 因子の変動を測定し、インターナル･コントロールを用いて補正を行う場合、2 種のレポーターとして緑色ルシフェラーゼ(GR)とオレンジ色ルシフェラーゼ(OR)を用い、インターナル･コントロールとして赤色ルシフェラーゼ(RED)を用いることをお勧めいたします。

使用するベクターの発現量の大小や、細胞株、実験条件に合わせて、**測定時の各ルシフェラーゼの発光活性比が1～100倍以内**になるようにインターナルコントロール量などプラスミドDNA量の最適化を行ってください。
プラスミド DNA 量の調整で各ルシフェラーゼの発光活性比が1～100倍以内に収まらない場合は、ベクターの組み合わせの再検討を行ってください。

Ⅶ. 「MultiColor-Luc™ Reporter Assay Kit」使用の準備

ⅰ. 試薬の準備

ⅰ-1) 発光試薬の準備

1.「MultiColor-Luc™ Reporter Assay Kit」の発光試薬を、遮光下にて室温静置して溶解させる。
2. 溶解後、試薬ビンをゆっくり数回反転させよく混合し、測定開始前までに試薬温度を室温に戻す。

*注: 本試薬は、温度や物理的な刺激などに大きな影響を受けます。試薬溶解時の 30°C以上のインキュベートや、混合時のボルテックスミキサー等を用いた激しい攪拌は避けてください。また、1 度の測定で使い切らない場合は、最初の解凍時に必要量ずつ小分けにして－80°Cで遮光保存し、2回以上の凍結融解を避けることをお勧めします。

ⅰ-2) 細胞溶解剤の調製

1.「MultiColor-Luc™ Reporter Assay Kit」の細胞溶解剤を、静置して室温に戻す。
2. 純水で 5 倍希釈し、よく混合してから使用する(*1, 2)。

*1: 本細胞溶解剤は 5 倍濃で供給されます。
*2: 本細胞溶解剤は、必ず用時調製してください。また、低い温度の場合には粘性が高くなりますので、十分に室温まで戻して使用してください。

ⅱ. 透過率の設定

サンプルの測定を行う前に、使用するルシフェラーゼの各フィルター透過率を求めます。<u>各発光波長における透過率の設定は、使用するRED、OR、GRルシフェラーゼを別々に発現させ、単色での発光活性測定を行います。</u>
※ 以下のプロトコールは、24 ウェル･プレートを用いてルシフェラーゼを発現させた接着細胞からのライセートを用いた操作法を示します。他のサイズのプレートを使用する際は、Ⅶ. の表1. (p.8)を参照してください

ⅱ-1) ライセートの調製

1.「MultiColor-Luc™ Control Vector(pSLG-SV40 control、pSLO-SV40 control、 pSLR-SV40 control)」3種をそれぞれ個別にトランスフェクションし、発現させた細胞から培養培地を取り除く。
2. 各培養ウェル内に、1 倍濃に調製した「MultiColor-Luc™ Reporter Assay Kit」の 細胞溶解剤 100 μLを加え、細胞表面が覆われるようプレートを数回まわす。(*1)
3. プレートを振とう機に移し、細胞が溶解剤で常に浸されている状態で、室温にて 15 分間振とうする。(*2)
4. ライセートを 1.5 mL チューブなどに移し、速やかに発光測定に使用する。(*3)

*1: 溶解剤は、各ウェル内の細胞表面が完全に覆われる必要最少量として設定しております。使用プレートの大きさの違いによって、細胞表面が完全に覆われない場合、細胞溶解剤の液量を増やしてください。
*2: 細胞株により溶解の程度が異なります。使用の細胞株に合わせて、30 分以内で溶解時間を最適化してください。
*3: ライセート回収直後の発光測定をお勧めしますが、ライセートの保存が必要な場合は、発光活性の維持のため-80°Cにて保存を行い、1 週間以内に凍結融解を繰り返さず測定を行ってください。

ⅱ-2) 発光測定

1. 測定時間などの測定条件の設定を行う。
2. 測定用チューブの底部に、回収した細胞ライセート 20 μL を取る。(*1)
3. 室温に戻した「MultiColor-Luc™ Reporter Assay Kit」の発光試薬 100 μLを静かに添加する。(*2,3)
4. 軽く振り、速やかに測定装置のチャンバーに入れ、各フィルター条件下で発光活性を測定する。(*4)

*1: Ⅹ. 参考例 表 3. (p.11) を参照し、『1. c. Auto Calc.』を OFF にして測定してください。
*2: 発光試薬の温度は必ず室温に戻してください。試薬温度が低い場合、測定値の低下やばらつきが生じる恐れがあります。
*3: 使用する細胞ライセートの液量ならびに発光試薬の添加量のばらつきは、発光活性値や発光カイネティクスへ影響を及ぼします。細胞ライセート量、発光試薬量の変更が必要な場合は、『細胞ライセート量：発光試薬量＝20：100』の比率を変えずに最適化してください。
*4: 試薬の添加、混合の際に、液が泡立たないよう注意してください。反応溶液の泡立ちは、測定値のばらつきの原因となります。

発光強度が高いほどバックグラウンドとの S:N 比が大きくなり安定した値が得られるため、使用する実験系において最も発光活性が高い条件にてトランスフェクションし、測定条件をそろえて、①フィルターなしの全光の測定値(F0)、②フィルターF1 を用いたときの測定値(F1)、③フィルターF2 を用いたときの測定値(F2)を測ります。これらの値より、使用するルシフェラーゼのフィルター透過率を算出し、各フィルター透過率を「ルミネッセンサーMCA」および「カラフルックアナライザー」にあらかじめ入力します(X.参考例 表 2.(p.11)を参照)。

iii. 測定条件の設定

サンプル測定のための測定条件を設定します。「ルミネッセンサーMCA」および「カラフルックアナライザー」では、各フィルターを一定間隔で自動的に切り替え、積算値を測定することができます(X.参考例の表 3.(p.11)を参照)。

iv. ライセートの調製

本システムでは、3 色の発光甲虫ルシフェラーゼの発光活性を最大限保持するため、「MultiColor-Luc™ Reporter Assay Kit」の 細胞溶解剤を用いて細胞溶解を行い、ライセートを回収します。使用する試薬の量は、プレートの大きさに応じて変更が必要です。各種マルチプレートの各ウェルに対する必要最少量は以下のとおりです。

表 1. 各プレートによる細胞溶解剤の使用量

プレートサイズ	溶解剤 (μL)	PBS (mL)
96 ウェルプレート	25	0.1
48 ウェルプレート	65	0.3
24 ウェルプレート	100	0.5
12 ウェルプレート	200	1
6 ウェルプレート	500	2

回収したライセートは速やかに氷中に移し、発光測定を行います(X.参考例、図 4.(p.11)を参照)。

v. 発光測定

「MultiColor-Luc™ Reporter Assay Kit 」の発光試薬を用いて、回収したライセートの発光活性を測定します。なお測定装置の設定に関する詳細については、使用する測定装置取扱説明書に従ってください。本取扱い説明書では、「ルミネッセンサーMCA」および「カラフルックアナライザー」を用いて、試薬分注をマニュアルで行う場合のプロトコールを示します。

なお測定開始前に、あらかじめ測定装置・測定チューブから生じるバックグラウンドの測定を行い、測定値の補正を行うことをお勧めします。実際のサンプル測定の前に、空キュベットからの各フィルター条件下での発光量を測定し、測定値より差し引いてください。

Ⅷ. 3 色のルシフェラーゼ発光測定のプロトコール
(3 レポーターの実験系、 2 レポーター＋インターナル･コントロールの実験系)

※ 本プロトコールは、24 ウェル･プレートを用いてルシフェラーゼを発現させた接着細胞を用いた操作法を示します。他のサイズのプレートを使用する際は、Ⅶ. 表1. (p.8)を参照してください。

1. 透過率の測定

3 色の発光甲虫ルシフェラーゼの透過率を算出し、「ルミネッセンサーMCA」および「カラフルックアナライザー」に入力します。Ⅶ. ⅱ. 透過率の設定(p.7)、およびⅩ. 参考例 表 2. (p.11) を参照してください。

2. 測定条件の設定

1.『1.a.Filter』では、2 枚を選択する。
2.『1.c.Auto Calc.』では、用いる 3 色の発光甲虫ルシフェラーゼの透過率を選択する。
3.『4.Analysis Time』では、測定時間＋5 秒の値を入力する。(*1)
4.『4.Integral Start』では 5 秒、『4.Integral End』では測定時間＋5 秒の値を入力する。

*1: 通常、各フィルターでの測定時間を 10～30 秒間になるよう設定します。しかし、発光活性が十分でない場合は、測定時間を長くするよう検討してください。

3. ライセートの調製

1.「MultiColor-Luc™ Reporter Vector」をトランスフェクションし、発現させた細胞から培養培地を取り除く。
2. 各培養ウェル内に、1 倍濃に調製した「MultiColor-Luc™ Reporter Assay Kit」の 細胞溶解剤 100 μLを加え、細胞表面が覆われるようプレートを数回まわす。(*1)
3. プレートを振とう機に移し、細胞が溶解剤で常に浸されている状態で、室温にて 15 分間振とうする。(*2)
4. ライセートを 1.5 mL チューブなどに移し、速やかに発光測定に使用する。(*3)

*1: 溶解剤は、各ウェル内の細胞表面が完全に覆われる必要最少量として設定しております。使用プレートの大きさの違いによって、細胞表面が完全に覆われない場合、細胞溶解剤の液量を増やしてください。
*2: 細胞株により溶解の程度が異なります。使用の細胞株に合わせて、30 分以内で溶解時間を最適化してください。
*3: ライセート回収直後の発光測定をお勧めしますが、ライセートの保存が必要な場合は、発光活性の維持のため-80℃にて保存を行い、1 週間以内に凍結融解を繰り返さず測定を行ってください。

4. 発光測定

1. 測定用チューブの底部に、回収した細胞ライセート 20 μL を取る。
2. 室温に戻した「MultiColor-Luc™ Reporter Assay Kit」の発光試薬 100 μLを静かに添加する。(*1,2)
3. 軽く振り、速やかに測定装置のチャンバーに入れ、各フィルター条件下で発光活性を測定する。(*3)

*1: 発光試薬の温度は必ず室温に戻してください。試薬温度が低い場合、測定値の低下やばらつきが生じる恐れがあります。
*2: 使用する細胞ライセートの液量ならびに発光試薬の添加量のばらつきは、発光活性値や発光カイネティクスへ影響を及ぼします。細胞ライセート量、発光試薬量の変更が必要な場合は、『細胞ライセート量：発光試薬量＝20：100』の比率を変えずに最適化してください。
*3: 試薬の添加、混合の際に、液が泡立たないよう注意してください。反応溶液の泡立ちは、測定値のばらつきの原因となります。

IX. 2色のルシフェラーゼ発光測定のプロトコール
(2レポーターの実験系、1レポーター＋インターナル･コントロールの実験系)

※ 本プロトコールは、24ウェル･プレートを用いてルシフェラーゼを発現させた接着細胞を用いた操作法を示します。他のサイズのプレートを使用する際は、VII. 表1. (p.8)を参照してください。

1. 透過率の測定

用いる2色の発光甲虫ルシフェラーゼの透過率を算出し、「ルミネッセンサーMCA」および「カラフルックアナライザー」に入力します。VII. ii. 透過率の設定(p.7)、およびX. 参考例 表2.(p.11)を参照してください。

2. 測定条件の設定

1.『1.a.Filter』では、GR+ORではF1、GR+REDではF2、OR+REDではF2の1枚を選択する。
2.『1.c.Auto Calc.』では、用いる3色の発光甲虫ルシフェラーゼの透過率を選択する。
3.『4.Analysis Time』では、測定時間＋5秒の値を入力する。(*1)
4.『4.Integral Start』では5秒、『4.Integral End』では測定時間＋5秒の値を入力する。

*1: 通常、各フィルターでの測定時間を 10～30 秒間になるよう設定します。しかし、発光活性が十分でない場合は、測定時間を長くするよう検討してください。

3. ライセートの調製

1.「MultiColor-Luc™ Reporter Vector」をトランスフェクションし、発現させた細胞から培養培地を取り除く。
2.各培養ウェル内に、1倍濃に調製した「MultiColor-Luc™ Reporter Assay Kit」の 細胞溶解剤 100 μLを加え、細胞表面が覆われるようプレートを数回まわす。(*1)
3.プレートを振とう機に移し、細胞が溶解剤で常に浸されている状態で、室温にて15分間振とうする。(*2)
4.ライセートを1.5 mLチューブなどに移し、速やかに発光測定に使用する。(*3)

*1: 溶解剤は、各ウェル内の細胞表面が完全に覆われる必要最少量として設定しております。使用プレートの大きさの違いによって、細胞表面が完全に覆われない場合、細胞溶解剤の液量を増やしてください。
*2: 細胞株により溶解の程度が異なります。使用の細胞株に合わせて、30 分以内で溶解時間を最適化してください。
*3: ライセート回収直後の発光測定をお勧めしますが、ライセートの保存が必要な場合は、発光活性の維持のため-80℃にて保存を行い、1週間以内に凍結融解を繰り返さず測定を行ってください。

4. 発光測定

1.測定用チューブの底部に、回収した細胞ライセート20 μLを取る。
2.室温に戻した「MultiColor-Luc™ Reporter Assay Kit」の発光試薬100 μLを静かに添加する。(*1,2)
3.軽く振り、速やかに測定装置のチャンバーに入れ、各フィルター条件下で発光活性を測定する。(*3)

*1: 発光試薬の温度は必ず室温に戻してください。試薬温度が低い場合、測定値の低下やばらつきが生じる恐れがあります。
*2: 使用する細胞ライセートの液量ならびに発光試薬の添加量のばらつきは、発光活性値や発光カイネティクスへ影響を及ぼします。細胞ライセート量、発光試薬量の変更が必要な場合は、『細胞ライセート量:発光試薬量＝20:100』の比率を変えずに最適化してください。
*3: 試薬の添加、混合の際に、液が泡立たないよう注意してください。反応溶液の泡立ちは、測定値のばらつきの原因となります。

X. 参考例

1. 透過率の測定

表 2. 透過率の測定および算出例

	フィルターなし F0 (count)	フィルター(O56) F1 (count)	フィルター(R60) F2 (count)	F1 透過率 T1	F2 透過率 T2
サンプル	(X)	(Y)	(Z)	(Y)/(X)	(Z)/(X)
RED	564,701	537,608	387,135	**0.952**	**0.686**
OR	5,932,734	4,334,701	1,461,892	**0.731**	**0.246**
GR	15,359,496	5,658,781	1,232,040	**0.368**	**0.080**

24well プレートにて培養した CHO-K1 細胞に各ルシフェラーゼ発現ベクターpSLR,O,G-SV40 を最大量トランスフェクションし、24 時間培養後ライセートを回収、各フィルター条件下で 30 秒間の発光活性を測定した。

2. 測定条件の設定

表 3. 3色ルシフェラーゼの場合における 30 秒間測定パラメーター例

項目	(項目説明)	入力値
1. Multicolor	測定モードの選択	ON
a. Filter	使用フィルターの選択 (3 色では、フィルターは 2 枚使用します。) (*1)	F1-F2
b. Step Time	フィルターの切り替え時間間隔の設定	1sec
c. Auto Calc.	発光値の自動算出機能の設定	ON
	(入力した透過率を確認した後、サンプルを選択します。) (*1)	＋＋＋
2. Photon Conv.	光子数換算の設定 (必須ではないため OFF とします。)	OFF
3. P-Int	インジェクターの設定 (マニュアルのため未使用とします。)	M (μL)
4. Analysis Time	各フィルターでの計測時間 (*2)	35sec
5. Result Format	計測結果の選択 (積算値と最大発光値から選択します。)	Intgral
6. Integral Start	測定開始時間の設定	5sec
End	測定終了時間の設定	35sec
7. Print Kinetic	発光カイネティクスデータの有無 (印刷の有無を選択します。)	OFF

*1：2色のルシフェラーゼを用いた場合は、使用されるルシフェラーゼに合わせて、フィルターF1 かフィルターF2 を選択します (GR＋OR： F1(O56), GR+RED： F2(R60), OR+RED： F2(R60))。

*2：各フィルターでの測定は、10～30 秒で設定を行います。ただし、測定値が低い、またはばらつく場合は、測定時間をより長くするなどの最適化を行ってください。

3. ライセートの安定性

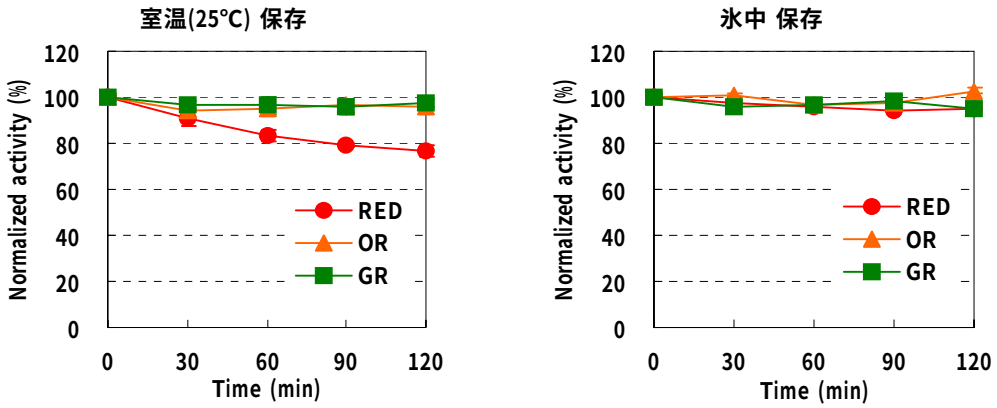

図 4. 3 色のルシフェラーゼ安定性

NIH3T3 細胞にて発現させた 3 色の発光甲虫ルシフェラーゼの細胞ライセートに発光試薬を添加し、20 秒間積算値を測定した。発光活性は、回収直後の活性を 100%とし 2 時間の安定性を示した。

赤色ルシフェラーゼ(RED)は、室温 (25°C) 2 時間で発光が約 25%低下し、氷中では 2 時間で発光が約 5%低下します。(図 4.)。緑色(GR)ならびにオレンジ色(OR)ルシフェラーゼは室温 (25°C)、氷中いずれの場合でも 2 時間で発光が約 5%低下します。

ＸＩ．トラブルシューティング

問題	原因	解決法
発光活性が低い、または発光しない。	ルシフェラーゼの発現量が低い、または発現していない。	① 使用されているプロモーターの転写活性が低い場合があります。より強いプロモーター、またはプラスミド量当たりの発光活性がより高いピッカジーン･アッセイシステム(お問い合わせ)の使用を検討ください。 ② 至適条件でトランスフェクションを行っていない場合があります。pSLG-SV40 をポジティブコントロールに用いて、使用になる細胞株での最適化を行ってください。 ③ プラスミドDNAに夾雑物が多い場合があります。プラスミドDNAの純度の確認を行ってください。
	ルシフェラーゼが失活している。	① ライセートの保存状態に問題がある場合があります。保存･測定時間が長い場合は、ライセートは氷中に保存してください。また、回収直後に測定できない場合は、－80℃にて保存し凍結融解は繰り返さないでください。 ② ライセートと発光試薬の混合時にボルテックスを用いて激しく攪拌すると失活する場合があります。測定チューブの振とう、または測定装置に付属する振とう機能を用いて穏やかに混合してください。
	使用している測定装置やフィルターの検出波長が合わない。	使用されている測定装置やフィルターの検出可能な波長域が異なる場合があります。本システムで使用する発光波長域を確認のうえ、測定装置･フィルターの使用を検討してください。
	各色のルシフェラーゼ発光活性比が大きすぎる。	発光活性比が大きすぎ、正確な補正値が算出できない場合があります。インターナル･コントロールによる発光量が大きすぎる、または小さすぎる際には、使用するプロモーターやプラスミド量を検討してください。
	細胞溶解ができていない。	本溶解剤に耐性を持つ細胞、または増殖しすぎた培養細胞では、完全に溶解できない場合があります。このようなときは、細胞溶解剤の液量を増やす、溶解時間を伸ばすなどの処理方法の最適化や、スクレイピングや凍結融解など他の溶解処理と組み合わせを検討してください。
	試薬が劣化している。	試薬保存状態により、試薬の劣化が起こっている場合があります。ホタルルシフェラーゼ酵素セット（メーカーコード FL-50）を用いて、試薬の活性を確認してください。
	発光測定システムが異なる。	ウミシイタケ･ルシフェラーゼは、本システムでは発光活性が得られません。
バックグラウンドが高い。	測定チューブ、プレートに汚れがある。	汚れや夾雑物により発光が低くなる場合があります。汚れ、夾雑物がないことを確認してください。
	測定装置の設置場所が不適切である。	測定装置の温度が高い、または強い光が当たっているようなとき、バックグラウンドが高くなる場合があります。使用されている測定装置取扱説明書を確認のうえ、最適な条件化で測定を行ってください。
活性値がばらつく。	ライセートと発光試薬の量比がプロトコールと異なる。	『ライセート量：発光試薬量＝20：100』の比率であるか確認してください。測定の際に、使用する細胞ライセートの液量ならびに発光試薬の添加量のばらつきは、発光活性値や発光カイネティクスへ影響を及ぼします。
	試薬の温度が低い、または温度が測定中に変化している。	試薬温度が室温一定になっていないとき、試薬の温度変化に伴って発光活性が変わる場合があります。測定前に試薬温度を室温まで戻し、一定の条件下で使用を心掛けてください。
	混合液が泡立っている。	混合液に泡が入っているとき、泡による乱反射により発光活性が大きくなったり、泡の破裂により発光カイネティクスが乱れたりする場合があります。本システムの細胞溶解剤には消泡剤が含まれていますが、ライセートと試薬を混合する際に確認してください。
	発光活性が低すぎる。	発光活性が低い場合、バックグラウンドとの S:N 比が取り難く値がばらつきます。測定時間を長くするなどの測定条件を検討してください。
	各色のルシフェラーゼ発光活性比が大きすぎる。	発光活性比が大きすぎ、正確な補正値が算出できない場合があります。使用するプロモーターやプラスミド量を検討してください。

	ライセートと発光試薬がよく混ざっていない。	測定チューブの振とう、または測定装置に付属する振とう機能を用いて穏やかに混合してください。
	ルシフェラーゼ、または発光試薬が失活し始めている。	ライセートと発光試薬の保存状態により、使用中に失活が起こる場合があります。できる限りライセートは氷中で保存し、発光試薬は 30℃以上の環境下での使用を避けてください。
再現性が取れない。	実験条件が異なる。	トランスフェクション方法・使用プラスミド量・回収方法・測定方法により、発光活性は大きく異なります。追試を行う場合は、同一の実験条件下で実施してください。
	細胞の状態が異なる。	細胞の密度、継代回数などにより、トランスフェクション効率やルシフェラーゼの発現量が異なる場合があります。できる限り新鮮な細胞を用いて、同一の実験条件化で実施してください。
	試薬が劣化している。	試薬の保存状態により、試薬の劣化が起こっている場合があります。ホタルルシフェラーゼ酵素キット（メーカーコード FL-50）を用いて、試薬の活性を確認してください。

XII. 関連製品

〈マルチカラールック™ アッセイシステム用ベクターシリーズ〉

メーカーコード	品　名	容 量
MCL-V11	**MultiColor-Luc™ pSLG-test Vector** SLGプロモーター挿入用ベクター (緑色発光用)	20μg
MCL-V12	**MultiColor-Luc™ pSLO-test Vector** SLOプロモーター挿入用ベクター (オレンジ色発光用)	20μg
MCL-V13	**MultiColor-Luc™ pSLR-test Vector** SLRプロモーター挿入用ベクター (赤色発光用)	20μg
MCL-V14	**MultiColor-Luc™ pSLG-SV40 Control Vector** SLG SV40コントロールベクター (緑色発光用)	20μg
MCL-V15	**MultiColor-Luc™ pSLO-SV40 Control Vector** SLO SV40コントロールベクター (オレンジ色発光用)	20μg
MCL-V16	**MultiColor-Luc™ pSLR-SV40 Control Vector** SLR SV40コントロールベクター (赤色発光用)	20μg
MCL-V17	**MultiColor-Luc™ pSLG-HSVtk Control Vector** SLG HSVtkコントロールベクター (緑色発光用)	20μg
MCL-VS1	**MultiColor-Luc™ Test Vector Set** pSLG-test、pSLO-test、pSLR-test Vector 各1本	各20μg ×3本
MCL-VS2	**MultiColor-Luc™ Control Vector Set** pSLG-SV40 Control、pSLO-SV40 Control、 pSLR-SV40 Control Vector 各1本	各 20μg ×3本
MCL-VS3	**MultiColor-Luc™ Vector Full Set** pSLG-test、pSLO-test、pSLR-test、 pSLG-SV40 Control、pSLO-SV40 Control、 pSLR-SV40 Control、 pSLG-HSVtk Control Vector 各1本	各 20μg ×7本

〈マルチカラールック™ TAクローニングキット〉

メーカーコード	品名	容量
MCL-C11	MultiColor-Luc™ SLO TA Cloning Kit	20回用
MCL-C12	MultiColor-Luc™ SLR TA Cloning Kit	20回用

〈マルチカラールック™ アッセイシステム用ベクター専用プライマー〉

メーカーコード	品名	容量
MCL-P21	**SLGOR-F primer** 挿入配列確認用プライマー (フォワード、pSLG、pSLO、pSLR共通)	200 pmols
MCL-P22	**SLGO-R primer** 挿入配列確認用プライマー (リバース、pSLG、pSLO共通)	200 pmols
MCL-P23	**SLR-R primer** 挿入配列確認用プライマー (リバース、pSLR用)	200 pmols

〈ホタルルシフェラーゼ酵素セット〉

メーカーコード	品名	容量
FL-50	**ホタルルシフェラーゼ酵素セット** (ホタルルシフェラーゼ酵素溶液+希釈溶液)	10μg/ml

XIII. 安全上のご注意

- 本製品を研究用途以外には使用しないでください。
- 本製品の廃棄は、滅菌後に焼却廃棄するか、または専門の廃棄物処理業者に委託して行ってください。
- 本製品に使用する他の試薬・器具・機械は、使用前に必ずおのおのの使用説明書をよく読み、その指示に従って調製・準備を行ってください。
- 本製品に使用する他の試薬・器具は必ず滅菌してください。
- 材質によっては、試薬の付着により腐食・変色する場合がありますので、試薬が付着した器具・機械は蒸留水でよく洗浄してください。

XIV. 使用方法のご注意

- 製品の安全性についてのご質問は、下記問い合わせ先にご連絡ください。
- 本製品を火気に近づけないでください。
- 試薬類を誤って飲み込んだ場合は、応急処置として水を飲ませ、直ちに医師の診断を受けてください。
- 手袋・保護用メガネ等により適切な身体保護を施し、試薬類の身体への接触を避けてください。万一、試薬類が目に入ったり、皮膚に付着した場合は、応急処置として水で洗い流し、直ちに医師の診断を受けてください。
- 使用期限と保存条件を厳守してください。
- その他、ご不明な点がございましたら、下記問い合わせ先までご連絡ください。

= お問い合わせ先 (9:00～17:30) =
東洋ビーネット(株) バイオプロダクツ部
〒104-0031 東京都中央区京橋 2-3-13
TEL: 03-3292-1954
FAX: 03-3272-8276
E-mail: bio@toyo-b-net.co.jp
HP: http://www.toyo-b-net.co.jp/